

28. 1. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 4 日
Date of Application:

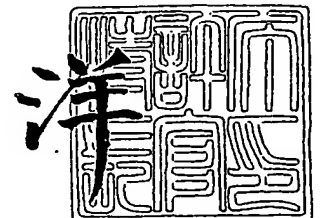
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 4 9 4 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 4 9 4 4]

出 願 人 宮 川 周 士
Applicant(s): 株式会社日本動物工学研究所

2 0 0 4 年 1 2 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 03YNH84
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 48/00

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県芦屋市津知町 3 - 1 2
【氏名】 宮川 周士

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府茨木市南春日丘 5 - 5 - 4 3
【氏名】 松浪 勝義

【特許出願人】
【識別番号】 503198688
【氏名又は名称】 宮川 周士

【特許出願人】
【識別番号】 503200095
【氏名又は名称】 株式会社日本動物工学研究所

【代理人】
【識別番号】 100085486
【弁理士】
【氏名又は名称】 廣瀬 孝美

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 069339
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0310154
【包括委任状番号】 0310153

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記のアミノ酸配列を有するHLA-Eキメラ分子。

(1)HLA-E分子の α 2ドメインの全部又は一部を、HLA-G1分子の α 2ドメインの全部又は一部に置換したHLA-Eキメラ分子、

(2)前記(1)と共に、HLA-E分子のシグナルペプチド(SP)を、HLA-G1分子のSPの一部を改変した改変型SPに置換したHLA-Eキメラ分子、又は

(3)前記(2)と共に、HLA-E分子の α 1ドメイン及び α 2ドメインのアミノ酸配列の一部を、それぞれHLA-G1分子の α 1ドメイン及び α 2ドメインのアミノ酸配列の一部に置換したHLA-Eキメラ分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載される各HLA-Eキメラ分子をコードする塩基配列。

【請求項 3】

請求項 2 に記載される塩基配列で形質転換された非ヒト哺乳動物細胞又は非ヒト哺乳動物。

【書類名】明細書

【発明の名称】HLA-Eキメラ分子

【技術分野】

【0001】

本発明はHLA-Eキメラ分子に関する。より詳細には、非ヒト哺乳類細胞にヒトNK細胞の細胞傷害障害活性に対する抵抗性を賦与するHLA-Eキメラ分子及び当該キメラ分子をコードする塩基配列、並びに当該塩基配列で形質転換された非ヒト哺乳類細胞及び非ヒト哺乳動物に関する。

【背景技術】

【0002】

臓器移植は極めて有用な治療法である。臓器移植には同種移植と異種移植があり、各々に長所と短所がある。ヒトからヒトへの同種移植には医療として確立されているという長所があるが、ドナーの数に限りがあるという短所がある。一方、非ヒト哺乳類（例えば、ブタ）からヒトへの異種移植には、多数の移植片の供給が可能である等の長所はあるが、超急性拒絶（HAR）や急性血管拒絶（AVR）と称される異種移植に特有な拒絶反応を生じるという短所がある。

そこで、異種移植に特有な拒絶反応の克服を目的として、非ヒト哺乳類にヒト補体制御因子を発現させる方法（例えば、特許文献1）、霊長類やヒトには存在しないが非ヒト哺乳類に存在する糖鎖非還元末端のGal α 1,3Gal配列（以下、 α -Gal抗原）を減少させる方法（例えば、特許文献2）、 α -Gal抗原の生成に係わっている α -1,3ガラクトシル転移酵素の遺伝子をノックアウトする方法（例えば、非特許文献1～2）などが開発されている。

【0003】

【特許文献1】特開平11-239430号公報

【特許文献2】特開平2002-291372号公報

【非特許文献1】Science 2002, 295, 1089

【非特許文献2】Nat. Biotechnol. 2002, 20, 251

【0004】

非ヒト哺乳類の移植片がヒトに移植されると、HARを克服できた場合でも、後者の抗体（抗 α -Gal抗体など）、補体、血小板、ナチュラルキラー（以下、NK）細胞が前者の細胞に付着して同細胞を活性化する。活性化された細胞は、各種サイトカインを放出し、ヘパリンを離脱し、隣接する細胞との間に隙間を生じ、基底膜のコラーゲンを露出させ、血液凝固反応を惹起し、血管を閉塞させ、非ヒト哺乳類の移植片を壊死させる（非特許文献3）。このような拒絶反応は急性血管拒絶AVRと称されるが、AVRの原因の一つであるNK細胞の細胞傷害活性を効率よく抑制する方法は開発されていなかった。

【0005】

【非特許文献3】Xenotransplantation 1998, 5, 169

【0006】

NK細胞は標的細胞と2種類の受容体を介して接着する。即ち、細胞傷害活性を誘導するキラー細胞活性化受容体、及び自己のMHCクラスI分子を認識して細胞傷害活性を抑制するキラー細胞抑制性受容体である。そして、前者からのシグナルが後者からのシグナルを上回る場合には、標的細胞を壊死させるが、後者からのシグナルが前者からのシグナルを上回る場合には、標的細胞を壊死させない。

ヒト細胞はHLAクラスI分子（HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G）を発現しているから、ヒト細胞はヒトNK細胞による細胞傷害を受けない。一方、非ヒト哺乳類細胞はヒトHLAクラスI分子を発現していないから、ヒトNK細胞による細胞傷害を受ける。そこで、非ヒト哺乳類細胞をヒトHLA-A、HLA-B、HLA-C又はHLA-Gの遺伝子で形質転換し、ヒトNK細胞による細胞傷害を回避する方法が開発された（特許文献3）。しかしHLA-A、HLA-BとHLA-Cは多型であり、それぞれ175種類、344種類と90種類の対立遺伝子が存在するから、それぞれのHLAに対応可能な非ヒト哺乳類細胞を調製することは实际的でなかった。

そこで、HLA-EとHLA-Gが多型でないことに着目して、HLA-EとHLA-Gの利用が試みられた

。その結果、非ヒト哺乳類細胞の表面にHLA-Gを発現させることは比較的容易であるが、ヒトNK細胞による細胞傷害抑制活性は低いこと、逆に非ヒト哺乳類細胞の表面にHLA-Eを発現させることは容易でないがヒトNK細胞による細胞抑制活性は高いこと、が分かった（非特許文献4）。

また非ヒト哺乳類細胞表面のHLA-E発現量を向上させる目的で、HLA-E、 β_2 ミクログロブリン及びHLA-A2のリーダーペプチド（Val-Met-Ala-Pro-Arg-Thr-Leu-Val-Leu）をコードする塩基配列、又はHLA-Gのリーダーペプチド（Val-Met-Ala-Pro-Arg-Thr-Leu-Phe-Leu）をコードする塩基配列を用いる試みもなされた。しかし、これら形質転換体のHLA-Eの発現量やNK細胞の細胞傷害抑制活性は十分でなかった（非特許文献5）。

【0007】

【特許文献3】特表平11-510698号公報

【非特許文献4】Transplantation Proceedings 2000, 32, 939

【非特許文献5】Transplantation 2002, 73, 1582

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は従来技術に存在する上記課題を解決するためになされたものであり、本発明者らは非ヒト哺乳類細胞にヒトNK細胞による細胞傷害活性への抵抗性を賦与するHLA-Eキメラ分子について鋭意検討し、

(1)HLA-E分子の α 2ドメインの全部又は一部を、HLA-G1分子の α 2ドメインの全部又は一部に置換したHLA-Eキメラ分子、

(2)前記(1)と共に、HLA-E分子のシグナルペプチド（SP）を、HLA-G1分子のSPの一部を改変した改変型SPに置換したHLA-Eキメラ分子、又は

(3)前記(2)と共に、HLA-E分子の α 1ドメイン及び α 2ドメインのアミノ酸配列の一部を、それぞれHLA-G1分子の α 1ドメイン及び α 2ドメインのアミノ酸配列の一部に置換したHLA-Eキメラ分子、

のそれぞれをコードする塩基配列を作成し、それらを用いて非ヒト哺乳類細胞を形質転換したところ、HLA-Eキメラ分子の発現量が増加すると共に、ヒトNK細胞による細胞傷害活性に対する抵抗性を増加することを見出して本発明を完成させた。

即ち、本発明は、非ヒト哺乳類細胞にヒトNK細胞による細胞傷害活性に対する抵抗性を賦与するHLA-Eキメラ分子、及びそれらをコードする塩基配列、並びに当該塩基配列で形質転換された非ヒト哺乳類細胞及び非ヒト哺乳動物を提供する。

なお、改変型SPとは、SPのアミノ酸配列の1又は2以上のアミノ酸が置換若しくは欠失され、又は1又は2以上のアミノ酸が付加された配列をいい、例えば、HLA-G1分子のSP(MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWA)を改変したSP(MAVMAPRTLVLLLSGALTLTETWA)が例示される。

また、HLA-E及びHLA-G1分子のアミノ酸配列及び塩基配列については後記する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記の課題を解決するための本発明の要旨は、非ヒト哺乳類細胞にヒトNK細胞による細胞傷害活性に対する抵抗性を賦与するHLA-Eキメラ分子及びそれらをコードする塩基配列であり、より具体的な例としては下記の性状を有するキメラ分子及びそれをコードする塩基配列が示される。

(1)改変型SPを有すると共に、HLA-E分子の α 2ドメインのアミノ酸91-182がHLA-G1分子の α 2ドメインのアミノ酸91-182に置換された以外はHLA-E分子であるHLA-Eキメラ分子（アミノ酸配列番号1）とそれをコードする塩基配列（塩基配列番号1）；

(2)改変型SPを有すると共に、HLA-E分子の α 2ドメインの後半部分のアミノ酸137-182がHLA-G1分子の α 2ドメインの後半部分のアミノ酸137-182に置換された以外はHLA-E分子であるHLA-Eキメラ分子（アミノ酸配列番号2）とそれをコードする塩基配列（塩基配列番号2）；

- (3) 改変型SPを有すると共に、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分のうちのその前半部分のアミノ酸137-150をHLA-G1分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分のうちのその前半部分のアミノ酸137-150に置換された以外はHLA-E分子であるHLA-Eキメラ分子（アミノ酸配列番号3）とそれをコードする塩基配列（塩基配列番号3）；
- (4) HLA-E分子のSP又は改変型SPを有し、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸147がシステインに置換された以外はHLA-E分子であるHLA-Eキメラ分子（アミノ酸配列番号4又は同5）とそれをコードする塩基配列（塩基配列番号4又は同5）；
- (5) HLA-E分子のSP又は改変型SPを有し、HLA-E分子の $\alpha 1$ ドメインのアミノ酸11がアラニンに置換されていると共に、 $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸147がシステインに置換されている以外はHLA-E分子であるHLA-Eキメラ分子（アミノ酸配列番号6又は同7）とそれをコードする塩基配列（塩基配列番号6又は同7）；及び
- (6) 前記(1)から(5)の何れかのHLA-Eキメラ分子をコードする塩基配列の一つで形質転換され作製された、ヒトNK細胞による細胞傷害活性に対する抵抗性を賦与された非ヒト哺乳類細胞又は非ヒト哺乳動物。

【発明の効果】**【0010】**

本発明のHLA-Eキメラ分子は非ヒト哺乳類細胞に効率よく発現するので、ヒトNK細胞による細胞傷害活性に対する抵抗性を非ヒト哺乳類細胞に賦与することができる。従って、本発明のHLA-Eキメラ分子は、非ヒト哺乳類の細胞、組織、臓器をヒトに異種移植する際に生じるヒトNK細胞による細胞傷害や急性血管拒絶（AVR）の発生の防止に奏効する。

【発明を実施するための最良の形態】**【0011】**

ヒトHLAクラスI分子はシグナルペプチド（SP）、 $\alpha 1$ ドメイン、 $\alpha 2$ ドメイン、 $\alpha 3$ ドメイン及び膜貫通（TM）ドメインから成り、これに β_2 ミクログロブリン（ $\beta_2 m$ ）が配された構造を採る。

また、ヒトHLAクラスI分子は、立体構造的に、 $\alpha 1$ ドメインと $\alpha 2$ ドメインで形成される溝に、シグナルペプチド（SP）に由来するオリゴペプチドを挟み込んで抗原提示する。

前述のように、非ヒト哺乳類細胞をHLA-Gの遺伝子を用いて形質転換させることは比較的容易であるが、ヒトNK細胞傷害活性抑制能は低い。逆に、非ヒト哺乳類細胞をHLA-Eの遺伝子を用いて形質転換させれば、より高いヒトNK細胞傷害活性抑制能を得られるが、形質転換させること自体が容易でない。そこで、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性を非ヒト哺乳類細胞に賦与することを目的として、HLA-G1分子とHLA-E分子の分子内ドメインを入れ換えたHLA-Eキメラ分子をコードする塩基配列を作製し、非ヒト哺乳類の細胞株を形質転換し、抗HLA抗体（B9.12.1、コスモバイオ）を使用して発現強度の増減をFACS解析し、鋭意検討した。そして後記の実施例が示すように、次に掲げるHLA-Eキメラ分子をコードする塩基配列で形質転換された非ヒト哺乳類細胞のHLA-E発現量は増加し、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性が増加することを見出した。

【0012】

- (1) HLA-E分子のSP（MVDGTL L L L L S E A L A L T Q T W A）をHLA-G1分子のSP（M V V M A P R T L F L L L S G A L T L T E T W A）を改変したSP（M A V M A P R T L V L L L S G A L T L T E T W A；後記実施例で使用した改変型SPである）と置換すると共に、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメイン（アミノ酸91-182）をHLA-G1分子の $\alpha 2$ ドメイン（アミノ酸91-182）に置換したHLA-Eキメラ分子、
- (2) HLA-E分子のSPを上記改変SPと置換すると共に、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分（アミノ酸137-182）をHLA-G1分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分（アミノ酸137-182）に置換したHLA-Eキメラ分子、
- (3) HLA-E分子のSPを上記改変SPと置換すると共に、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分のうちのその前半部分（アミノ酸137-150）をHLA-G1分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分のうちのその前半部分（アミノ酸137-150）に置換したHLA-Eキメラ分子、
- (4) HLA-E分子のSPを上記改変SPと置換する又は置換しないで、HLA-E分子の $\alpha 2$ ドメイン

のアミノ酸147のセリンをHLA-G1分子の α 2ドメインのアミノ酸147のシステインに置換したHLA-Eキメラ分子、及び

(5) HLA-E分子のSPを上記改変SPと置換する又は置換しないで、HLA-E分子の α 1ドメインのアミノ酸11のセリン及び同 α 2ドメインのアミノ酸147のセリンのそれぞれをHLA-G1分子の α 1のアミノ酸11のアラニン及び同 α 2のアミノ酸147のシステインに置換したHLA-Eキメラ分子。

【0013】

上記(1)から(5)に記載の何れか一つのHLA-Eキメラ分子をコードする塩基配列と遺伝子プロモーター（例えば、 β アクチンのプロモーター、pMCPのプロモーターなど）及び／又はその他の発現調節配列からなる導入遺伝子を構築し、非ヒト哺乳類の細胞を形質転換すれば、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性を有する非ヒト哺乳類細胞を調製することができる。

また当該導入遺伝子をマイクロインジェクション法により非ヒト哺乳類の受精卵に注入すれば、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性を有する細胞、組織、臓器から成る非ヒトトランスジェニック哺乳動物を調製することができる。本発明における非ヒトトランスジェニック哺乳動物は、ヒト以外の哺乳動物であれば特に限定されず、例えば、ブタ、マウス、ラット、ハムスター、ウシ、ウマ、ヒツジ、ウサギ、イヌ、ネコなどが例示され、異種移植を考慮すると、ドナーとして好適なブタが好ましい。

さらに、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性を有する非ヒト哺乳類細胞をドナー細胞として核移植法を適用すれば、ヒトNK細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性を有する細胞、組織、臓器から成る非ヒトクローン哺乳動物を調製することができる。これらの非ヒトトランスジェニック哺乳動物又は非ヒトクローン哺乳動物の作製方法としては、公知の方法及び至適条件を適宜選択すればよい。

【0014】

HLA-Eのアミノ酸配列は以下のとおりである。

HLA-E アミノ酸配列

MVDGTL L L L L L S E A L A L T Q T W A G S H S L K Y F H T S V S R P G R G E P R F I S V G Y V D D T Q F V R F D N D A A S P R M V P R A
P W M E Q E G S E Y W D R E T R S A R D T A Q I F R V N L R T L R G Y Y N Q S E A G S H T L Q W M H G C E L G P D R R F L R G Y E Q F A Y D
G K D Y L T L N E D L R S W T A V D T A A Q I S E Q K S N D A S E A E H Q R A Y L E D T C V E W L H K Y L E K G K E T L L H L E P P K T H V
T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q Q D G E G H T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C
H V Q H E G L P E P V T L R W K P A S Q P T I P I V G I I A G L V L L G S V V S G A V V A A V I W R K K S S G G K G G S Y S K A E W S D S A
Q G S E S H S L *

(SP)

MVDGTL L L L L L S E A L A L T Q T W A

(α 1ドメイン)

G S H S L K Y F H T S V S R P G R G E P R F I S V G Y V D D T Q F V R F D N D A A S P R M V P R A
P W M E Q E G S E Y W D R E T R S A R D T A Q I F R V N L R T L R G Y Y N Q S E A

(α 2ドメイン)

G S H T L Q W M H G C E L G P D R R F L R G Y E Q F A Y D
G K D Y L T L N E D L R S W T A V D T A A Q I S E Q K S N D A S E A E H Q R A Y L E D T C V E W L H K Y L E K G K E T L L H L

(α 3ドメイン)

E P P K T H V
T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q Q D G E G H T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C
H V Q H E G L P E P V T L R W

(膜貫通ドメイン)

K P A S Q P T I P I V G I I A G L V L L G S V V S G A V V A A V I W R K K S S G G K G G S Y S K A E W S D S A
Q G S E S H S L *

【 0 0 1 5 】

HLA-Eの塩基配列は以下のとおりである。

HLA-E 塩基配列

atggtagatggaaccctccttttactcctctcggaggccctggcccttaccagacctgg
gctgggtcccactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccggcccgccgcggggag
ccccgttcatctctgtgggtacgtggacgacacccagttcgtgcgttcgacaacgac
gccgcgagtccgaggatggtgccgcgggcgcgtggatggagcaggaggggtcagagtat
tgggaccgggagacacggagcggcaggacaccgcacagattttccgagtgaatctgcgg
acgtgcgcggctactacaatcagagcgaggccgggtctcacacccctgcagtggatgcat
ggctgcgagctggggcccgacaggcgttccctccgcgggtatgaacagttcgccctacgac
ggcaaggattatctcaccctgaatgaggacctgcgctcctggaccgcggtggacacggcg
gctcagatctccgagcaaaagtcaaagtatgcctctgaggcggagcaccagagagcctac
ctggaagacacatgcgtggagtggctccacaaataacctggagaaggggaaggagacgctg
cttcacctggagcccccaaagacacacgtgactcaccaccccatctctgaccatgaggcc
accctgaggtgctggggccctgggcttctacctgcggagatcacactgacctggcagcag
gatggggaggggccatacccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatgga
accttccagaagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgc
catgtgcagcatgaggggtacccgagcccgctacccctgagatggaagccggcttcccag
cccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctgggttctccttggatctgtggtctct
ggagctgtggttgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggtggaaaaggagggagc
tactctaaggctgagtggagcgacagtgccagggggtctgagtctcacagcttgtaa

【 0 0 1 6 】

HLA-G1のアミノ酸配列は以下のとおりである。

HLA-G1 アミノ酸配列

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRME
PRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMI GCDLGSDGRLLRGYEQY
AYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTQVEWLHRYLENGKEMLQRADPPK
THVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQR
YTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGI VAGLVVLA AVVTGA AVA AVLWRKKSSD*

(SP)

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWA

(α 1ドメイン)

GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRME
PRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA

(α 2ドメイン)

SSHTLQWMI GCDLGSDGRLLRGYEQY
AYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTQVEWLHRYLENGKEMLQRA

(α 3ドメイン)

DPPK
THVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQR
YTCHVQHEGLPEPLMLRW

(膜貫通ドメイン)

KQSSLPTIPIMGI VAGLVVLA AVVTGA AVA AVLWRKKSSD*

【0017】

HLA-G1の塩基配列は以下のとおりである。

HLA-G1 塩基配列

atggtggtcatggcgccccgaaccctcttctctgctactctcgggggccctgaccctgacc
gagacctgggcgggctcccactccatgaggtatttcagcgccgccgtgtcccggccccggc
cgcggggagccccgcttcatcgccatgggctacgtggacgacacgcagttcgtgcggttc
gacagcgactcggcgtgtccgaggtggagccgcgggcgccgtgggtggagcaggagggg
ccagagtattgggaagaggagacacggaacaccaaggcccacgcacagactgacagaatg
aacctgcagaccctgcgcggctactacaaccagagcgaggccagttctcacaccctccag
tggatgattggctgcgacctgggggtccgacggtcgccctcctccgcggtatgaacagtat
gcctacgatggcaaggattacctcgccctgaacgaggacctgcgctcctggaccgcagcg
gacactgcggctcagatctccaagcgcaagtgtgaggcgccaatgtggctgaacaaagg
agagcctacctggaggggcacgtgcgtggagtgggtccacagataacctggagaacgggaag
gagatgctgcagcgcgcggaaccccccaagacacacgtgaccaccaccctgtctttgac
tatgaggccaccctgaggtgctggggccctgggcttctaccctgcggagatcatactgacc
tggcagcgggatggggaggaccagaccaggacgtggagctcgtggagaccaggcctgca
gggatggaaccttccagaagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagaga
tacacgtgccatgtgcagcatgaggggctgccggagccccctcatgctgagatggaagcag
tcttccctgcccaccatcccatcatgggtatcgttgctggcctgggtgtccttgacgct
gtagtcactggagctgcggctcgctgctgtgctgtggagaaagaagagctcagattga

【 0 0 1 8 】

アミノ酸配列番号 1 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 1

(改変型 SP):

MAVMAPRTLVL LLLSGALTLT ETWA

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT SVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

SSHTLQWMIG CDLGSDGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL
RSWTAADTAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWLHR
YLENGKEMLQ RA

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA AVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVTL RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSES HSL*

【0019】

塩基配列番号 1 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 1

(改変型 SP):

atggcggtcatggcgccccgaaccctcgtcctgct~~atctcgggggcctgaccctgacc~~
gagacctgggcg

(α 1 ドメイン):

ggctcccaactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccggcccggcggggagccc
cgcttcatctctgtgggctacgtggacgacaccagttcgtgcttcgacaacgacgcc
gcgagtcaggagatggtgccgccccgctggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccagggacaccgcacagatttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgaggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

~~agtttcacacccctccagtggatgattggctgcgacctgggggtccgacggtcgccctctc~~
~~cgcgggtatgaacagtatgcctacgatggcaaggattacctcgccctgaacgaggacctg~~
~~cgctcctggaccgcagcggacactgcggctcagatctccaagcgcaagtgtgaggcggcc~~
~~aatgtggctgaacaaaggagagcctacctggagggcacgtgcgtggagtggctccacaga~~
~~tacctggagaacgggaaggagatgctgcagcgccg~~

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccaccctgagg
tgctggggccctgggcttctaccctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggccataccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctacccgagcccgtcaccctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggttgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggaggactactctaaggctgagtggagcgacagtgccaggggtctgagttc
cacagcttgtaa

【0020】

アミノ酸配列番号 2 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 2

(改変型 SP):

MAVMAPRTLVL LLSGALTLT ETWA

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT SVSRPGRGEP RFISVGIVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVP RAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVD TAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWLHR
YLENGKEMLQ RA

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA AVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVT L RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSSES HSL*

【0021】

塩基配列番号 2 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 2

(改変型 SP):

atggcggtcatggcgccccgaaccctcgctcgtgctactctcgggggccctgaccctgacc
gagacctgggcg

(α 1 ドメイン):

ggctcccactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccgccccggccgaggagccc
cgcttcactctctgtgggctacgtggacgacaccagttcgtgcgcttcgacaacgacgcc
gcgagtcgaggatggtgccgccccggcgctggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccagggacaccgcacagattttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgaggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggtctcacaccctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttcctc
cgcggtatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctcacctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacactgcggctcagatctccaagcgcaagtgtgaggcgccaatg
tggctgaacaaaggagagcctacotggagggcacgtgcgtggagtggctccacagatacct
ggagaacgggaaggagatgctgcagcgcgcg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccacctgagg
tgctggggccctgggcttctacctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggcataaccagacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaacctccag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctaccgagcccgctcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgctgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggttgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgacagtgccaggggtctgagctt
cacagcttgtaa

【 0 0 2 2 】

アミノ酸配列番号 3 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 3

(改変型 SP):

MAVMAPRTLVL LLSGALTILT ETWA

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT SVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDTA QIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVDTAA QISKRKCEAA SEAEHQRAYL EDTCVEWLHK
YLEKGKETLL HL

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA AVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVTL RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSES HSL*

【0023】

塩基配列番号 3 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 3

(改変型 SP):

atggcggtcatggcgccccgaaccctcgctcgtctctcgggggcctgaccctgacc
gagacctgggcg

(α 1 ドメイン):

gggtccactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccggcccgccgaggagccc
cgcttcattctgtgtgggtacgtggacgacaccagttcgtgcgcttcgacaacgacgcc
gcgagtcgaggatggtgccgcccggcgccgtggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccaggacaccgcacagatttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgcggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggttcacaccctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttcctc
cgcggttatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctaccctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacactgcccgtcagatctccaagcgcaagtgtgaggcgccc
tctgaggcggagcaccagagagcctacctggaagacacatgcctggagtggctccacaat
acctggagaaggggaaggagacgctgcttcacctg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccaccctgagg
tgctggggcctgggcttctaccctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggccataccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctaccgagcccgtcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggttgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgacagtgccaggggtctgagctt
cacagcttgtaa

【 0 0 2 4 】

アミノ酸配列番号 4 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 4

(HLA-E の SP):

MVDGTL~~LL~~L SEALALTQ~~T~~W A

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT SVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVDTAA QISEQKCNDA SEAEHQRAYL EDTCVEWLHK
YLEKGKETLL HL

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA~~A~~VVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVT~~L~~ RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSSES HSL*

【0025】

塩基配列番号 4 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 4

(HLA-E の SP):

atggtagatggaaccctccttttactcctcggaggccctggcccttaccagacctgg
gcg

(α 1 ドメイン):

ggctccactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccggcccgccgaggagccc
cgcttcatctctgtgggctacgtggacgacaccagttcgtgcgttcgacaacgacgcc
gcgagtccgaggatgggtgccgaggcgccgtggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccagggacaccgcacagattttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggtctcacaccctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttctc
cgcggtatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctcacctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacacggcggtcagatctccgagcaaaagtgtaatgatgcc
tctgaggcggagcaccagagagccgtacctggaagacacatgcgtggagtggctccacaaa
tacctggagaaggggaaggagacgctgcttcacctg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccaccctgagg
tgctgggccctgggcttctaccctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggcataaccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctaccgagcccgtcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggttgcgtgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgcagtgcccaggggtctgagtct
cacagcttgtaa

【 0 0 2 6 】

アミノ酸配列番号 5 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 5

(改変型 SP):

MAVMAPRTLVL LLSGALTLT ETWA

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT SVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVDATA QISEQKCNDASEAEHQRAYL EDTCVEWLHK
YLEKGKETLL HL

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA AVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVTL RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSES HSL*

【0027】

塩基配列番号 5 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 5

(改変型 SP):

atggcggatcatggcgccccgaaccctcgtcctgctactctcgggggcctgaccctgacc
gagacctgggcg

(α 1 ドメイン):

ggctcccactccttgaagtatttccacacttccgtgtcccgccccggcgcggggagccc
cgcttcatctctgtgggctacgtggacgacacccagttcgtgcgcttcgacaacgacgcc
gcgagtcaggagatgggtccgcggcgccgtggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccaggacaccgcacagatttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgcggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggtctcacaccctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttcctc
cgcggtatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctaccctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacacggcggtcagatctccgagcaaaagtgaatgatgcc
tctgaggcggagcaccagagagccgtacctggaagacacatgcgtggagtggctccacaaa
tacctggagaaggggaaggagacgctgcttcacctg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccaccctgagg
tgctgggccctgggcttctaccctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggccatacccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctacccgagcccgtcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggtgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgacagtgcccaggggtctgagtct
cacagcttgtaa

【0028】

アミノ酸配列番号 6 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 6

(HLA-E の SP):

MVDGTL~~LL~~LL~~L~~SEALALTQTW A

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT AVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVD~~T~~A~~A~~ QISEQK~~C~~NDA SEAEHQRAYL EDTC~~V~~E~~W~~LHK
YLEKGKETLL HL

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWA~~A~~V~~V~~VPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVTL RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGIIAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSES HSL*

【0029】

塩基配列番号 6 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 6

(HLA-E の SP):

atggtagatggaaccctccttttactcctcctcgaggccctggcccttaccagacctgg
gcg

(α 1 ドメイン):

ggctccactccttgaagtatttccacactgccgtgtcccggcccgccggggagccc
cgcttcattctgtgtgggtacgtggacgacacccagttcgtgcgcttcgacaacgacgcc
gcgagtccgaggatggtgccgcggcgccgtggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccagggaacccgcacagattttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgcggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggtctcacaccctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttcctc
cgcggtatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctcacctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacacggcggtcagatctccgagcaaaagtgtaatgatgcc
tctgaggcggagcaccagagagccgtacctggaagacacatgcgtggagtggctccacaaa
tacctggagaagggaaggagacgctgcttcacctg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccaccctgagg
tgctgggcctgggcttctaccctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggcataaccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctacccgagcccgtcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggtgctgctgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgacagtgccaggggtctgagtct
cacagcttgtaa

【 0 0 3 0 】

アミノ酸配列番号 7 の配列は以下のとおりである。

アミノ酸配列番号 7

(改変型 SP):

MAVMAPRTLVL LLSGALTLT ETWA

(α 1 ドメイン):

GSHSLKYFHT AVSRPGRGEP RFISVGYVDD TQFVRFDNDA
ASPRMVPRAP WMEQEGSEYW DRETRSARDT AQIFRVNLRT
LRGYYNQSEA

(α 2 ドメイン):

GSHTLQWMHG CELGPDRRFL RGYEQFAYDG KDYLTLNEDL
RSWTAVDTAA QISEQKCNDASEAEHQRAYL EDTCVEWLHK
YLEKGKETLL HL

(α 3 ドメイン):

EPPKTHVTHH PISDHEATLR CWALGFYPAE ITLTWQQDGE
GHTQDTELVE TRPAGDGTFQ KWAAVVPSG EEQRYTCHVQ
HEGLPEPVTL RW

(膜貫通ドメイン):

KPASQPTIPI VGHAGLVLL GSVVSGAVVA AVIWRKKSSG
GKGGSYSKAE WSDSAQGSES HSL*

【0031】

塩基配列番号 7 の配列は以下のとおりである。

塩基配列番号 7

(改変型 SP):

atggcgggtcatggcgccccgaaccctcgtcctgctactctcgggggccctgaccctgacc
gagacctgggcg

(α 1 ドメイン):

ggctccactccttgaagtatttccacactgccgtgtcccggccggcggggagccc
cgcttcattctgtgggctacgtggacgacaccagttcgtgcgttcgacaacgacgcc
gcgagtcaggatggtgccggggcgccgtggatggagcaggaggggtcagagtattgg
gaccgggagacacggagcgccaggacaccgcacagatttccgagtgaatctgcggacg
ctgcgggctactacaatcagagcgaggcc

(α 2 ドメイン):

gggtctcacacctgcagtggatgcatggctgcgagctggggcccgacaggcgcttcctc
cgcggtatgaacagttcgctacgacggcaaggattatctaccctgaatgaggacctg
cgctcctggaccgcggtggacacggcggtcagatctccgagcaaaagtgtaatgatgcc
tctgaggcggagcaccagagagccgtacctggaagacacatgcgtggagtggctccacaaa
tacctggagaaggggaaggagacgctgcttcacctg

(α 3 ドメイン):

gagccccaaagacacacgtgactcaccacccatctctgaccatgaggccacctgagg
tgctggggccctgggcttctacctgcggagctcacactgacctggcagcaggatggggag
ggccatacccaggacacggagctcgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcag
aagtgggcagctgtggtggtgccttctggagaggagcagagatacacgtgccatgtgcag
catgaggggctaccgagcccgtcacctgagatgg

(膜貫通ドメイン):

aagccggcttcccagcccaccatccccatcgtgggcatcattgctggcctggttctcctt
ggatctgtggtctctggagctgtggttgcgtgtgatatggaggaagaagagctcaggt
ggaaaaggaggagctactctaaggctgagtggagcgacagtcccaggggtctgagtct
cacagcttgtaa

【実施例】

【0032】

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例 1

各種HLA-Eキメラ分子の非ヒト哺乳類細胞での発現 (1)

表 1 に記載の構成から成るアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現ベクターである pC

XN (チキンの β アクチンプロモーター、CMV のエンハンサーを有する) に導入した。次に各導入遺伝子を CHO 細胞に導入し、抗 HLA 抗体 (Pan-Class I 抗体、B9.12.1、コスモバイオ) を用いて FACS 解析し、発現量の相対値を求めた。その結果を表 1 に示す。

【0033】

表 1. 各種 HLA-E キメラ分子の非ヒト哺乳類細胞に於ける発現

| 記号 | 分子の構成 | 発現相対量 |
|---------------------------------|--|-------|
| (1) HLA-G1 | HLA-G1 分子 | 100 |
| (2) HLA-E | HLA-E 分子 | <1 |
| (3) HLA-E(V) | 上記(2)の SP を改変型 SP に置換 | 2 |
| (4) E(V)-TM | 上記(3)の TM を上記(1)の TM に置換 | 2 |
| (5) E(V)- $\alpha 3$ TM | 上記(3)の $\alpha 3$ TM を上記(1)の $\alpha 3$ TM に置換 | <1 |
| (6) E(V)- $\alpha 2$ | 上記(3)の $\alpha 2$ を上記(1)の $\alpha 2$ に置換 | 62 |
| (7) E(V)- $\alpha 1\alpha 3$ TM | 上記(3)の $\alpha 1$, $\alpha 3$ と TM を上記(1)の $\alpha 1$, $\alpha 3$ と TM に置換 | <1 |
| (8) E(V)- $\alpha 1$ | 上記(3)の $\alpha 1$ を上記(1)の $\alpha 1$ に置換 | <1 |
| (9) E(V)- $\alpha 1$ -1 | 上記(3)の $\alpha 1$ の前半部分を上記(1)の $\alpha 1$ の前半部分に置換 | <1 |
| (10) E(V)- $\alpha 1$ -2 | 上記(3)の $\alpha 1$ の後半部分を上記(1)の $\alpha 1$ の後半部分に置換 | <1 |
| (11) E(V)- $\alpha 2$ -1 | 上記(3)の $\alpha 2$ の前半部分を上記(1)の $\alpha 2$ の前半部分に置換 | <1 |
| (12) E(V)- $\alpha 2$ -2 | 上記(3)の $\alpha 2$ の後半部分を上記(1)の $\alpha 2$ の後半部分に置換 | 29 |
| (13) E(V)- $\alpha 2$ -2-1 | 上記(3)の $\alpha 2$ の後半部分のうちの前半部分を上記(1)の $\alpha 2$ の後半部分のうちの前半部分に置換 | 26 |
| (14) E(V)- $\alpha 2$ -2-2 | 上記(3)の $\alpha 2$ の後半部分のうちの後半部分を上記(1)の $\alpha 2$ の後半部分のうちの後半部分に置換 | 4 |

(注 1) 改変型 SP: MAVMAPRTLVLVLLSGALTLTETWA

(注 2) SP: シグナルペプチド、 $\alpha 1$: $\alpha 1$ ドメイン、 $\alpha 2$: $\alpha 2$ ドメイン、 $\alpha 3$: $\alpha 3$ ドメイン、TM: 膜貫通ドメイン。

【0034】

表 1 に示す結果から、HLA-E 分子の SP 配列を HLA-G1 の SP に類似する改変型 SP (MAVMAPRTLVLVLLSGALTLTETWA) に置換すると共に、HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメイン (アミノ酸 91-182)、HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分 (アミノ酸 137-182) 又は HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインの後半部分のうちのその前半部分 (アミノ酸 137-150) をそれぞれに対応する HLA-G1 分子のアミノ酸配列に置換することによって、HLA-E キメラ分子は効率よく CHO 細胞上に発現することが確認された。

【0035】

実施例 2

各種 HLA-E キメラ分子の非ヒト哺乳類細胞での発現 (2)

表 2 に記載の構成から成るアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現ベクターである pC XN に導入した。次に各導入遺伝子を CHO 細胞に導入し、抗 HLA 抗体を用いて FACS 解析した。その結果を表 2 に示す。

【0036】

表 2. 各種 HLA-E キメラ分子の非ヒト哺乳類細胞に於ける発現

| 記号 | 分子の構成 | FACS のピーク |
|------------------|---|-----------|
| (1) Vector | ベクターのみ | 4.94 |
| (2) HLA-E | HLA-E 分子 | 15.07 |
| (3) HLA-E(V) | 上記(2)の SP を改変型 SP に置換 | 36.84 |
| (4) HLA-E(147) | 上記(2)の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸 147 のセリンをシステインに置換 | 121.84 |
| (5) HLA-E(Vx147) | 上記(4)の SP を改変型 SP に置換 | 313.97 |

【0037】

表 2 に示す結果から、HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸 147 のセリンを HLA-G1 分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸 147 のシステインに置換した HLA-E キメラ分子は効率よく CHO 細胞上に発現することが確認された、また HLA-E 分子の SP 配列を改変型 SP (MAVMAPRTLVLVLLSGALTLTETWA) に置換すると共に HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸配列番号 147 をシステインに置換した HLA-E キメラ分子はさらに効率よく CHO 細胞上に発現することが確認された。セリンの β 位の水酸基 (-OH) をシステインのチオール基 (-SH) に置換することにより HLA-E キメラ分子はさらに効率よく CHO 細胞上に発現することが確認された。

【0038】

実施例 3

HLA-E キメラ分子を発現する非ヒト哺乳類細胞のヒト NK 細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性

表 3 に記載の構成から成るアミノ酸配列をコードする塩基配列を発現ベクターである pCXN に導入した。次に各導入遺伝子をブタ血管内皮細胞 (SEC) に導入し、各安定細胞株を作製した。各形質転換 SEC 細胞にヒト NK 様細胞 (YT) を 5:1 の割合で作用させ (37℃、4 時間)、SEC から遊離される乳酸脱水素酵素 (LDH) を指標としてヒト NK 細胞の細胞傷害活性を測定し、細胞傷害率の相対値を求めた。その結果を表 3 に示す。

【0039】

表 3. 各種ブタ血管内皮細胞のヒト NK 細胞の細胞傷害活性に対する抵抗性

| 形質転換細胞 | 内容 | 細胞傷害率 (相対値) |
|---------------------|---|------------------|
| (1) SEC | 遺伝子導入操作なし | 100 ^a |
| (2) Mock | Mock 遺伝子を導入 | 94 ^a |
| (3) HLA-E(V) | HLA-E 分子の SP を改変型 SP に置換した HLA-E キメラ分子をコードする塩基配列で形質転換 | 85 ^b |
| (4) HLA-E(V,147) | HLA-E 分子の SP を改変型 SP に置換すると共に、HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸 147 をシステインに置換した HLA-E キメラ分子をコードする塩基配列で形質転換 | 35 ^c |
| (5) HLA-E(V,11,147) | 上記(4)に加え、 $\alpha 1$ ドメインのアミノ酸 11 をアラニンに置換した HLA-E キメラ分子をコードする塩基配列で形質転換 | 21 ^d |

(注) ^{a, b, c, d}: 異なる上付き文字を有する群間では有意差あり (P<0.05)。

【0040】

表 3 に示す結果から、HLA-E 分子の SP を改変型 SP に置換した HLA-E キメラ分子、HLA-E 分子の SP を改変型 SP に置換すると共に HLA-E 分子の $\alpha 2$ ドメインのアミノ酸 147 をシステイン

に置換したHLA-Eキメラ分子、及び、上記に加え α 1ドメインのアミノ酸11をアラニンに置換したHLA-Eキメラ分子、の何れかをコードする塩基配列で形質変換されたブタ血管内皮細胞はヒトNK細胞による細胞傷害を抑制することが確認された。

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 非ヒト哺乳類細胞にヒトNK細胞による細胞傷害活性を抑制するHLA-Eキメラ分子、当該キメラ分子をコードする塩基配列、同塩基配列で形質転換された非ヒト哺乳類細胞及び当該哺乳動物を提供する。

【解決手段】 本発明のHLA-Eキメラ分子は、HLA-Eのシグナルペプチド領域、 $\alpha 1$ ドメイン及び／又は $\alpha 2$ ドメインの全部又は一部を改変したペプチドであり、また本発明の塩基配列は当該キメラ分子をコードする塩基配列である。本発明の塩基配列を導入した形質転換体はHLA-Eを効率的に発現するという効果を有する。

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 3 - 3 7 4 9 4 4 |
| 受付番号 | 5 0 3 0 1 8 2 4 9 1 0 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0 0 9 4 |
| 作成日 | 平成 1 6 年 3 月 4 日 |

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 1 5 年 1 1 月 4 日

特願 2 0 0 3 - 3 7 4 9 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 1 9 8 6 8 8]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 6 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県芦屋市津知町 3 - 1 2

氏 名

宮川 周士

特願 2 0 0 3 - 3 7 4 9 4 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 2 0 0 0 9 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 6 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市緑ヶ原 3 - 3

氏 名

株式会社日本動物工学研究所

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016776

International filing date: 04 November 2004 (04.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-374944
Filing date: 04 November 2003 (04.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 February 2005 (24.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse